

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

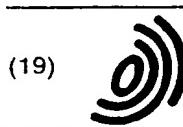
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(11)

EP 1 077 263 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
21.02.2001 Patentblatt 2001/08

(21) Anmeldenummer: 99114811.5

(22) Anmeldetag: 29.07.1999

(51) Int Cl.7: C12N 15/58, C12N 15/62,
C12N 15/31, C12N 9/72,
C07K 14/245, C07K 1/113,
C12N 1/20, C12N 15/70,
C12P 21/02

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(71) Anmelder: F.HOFFMANN-LA ROCHE AG
4070 Basel (CH)

(72) Erfinder: Die Erfindernennung liegt noch nicht vor

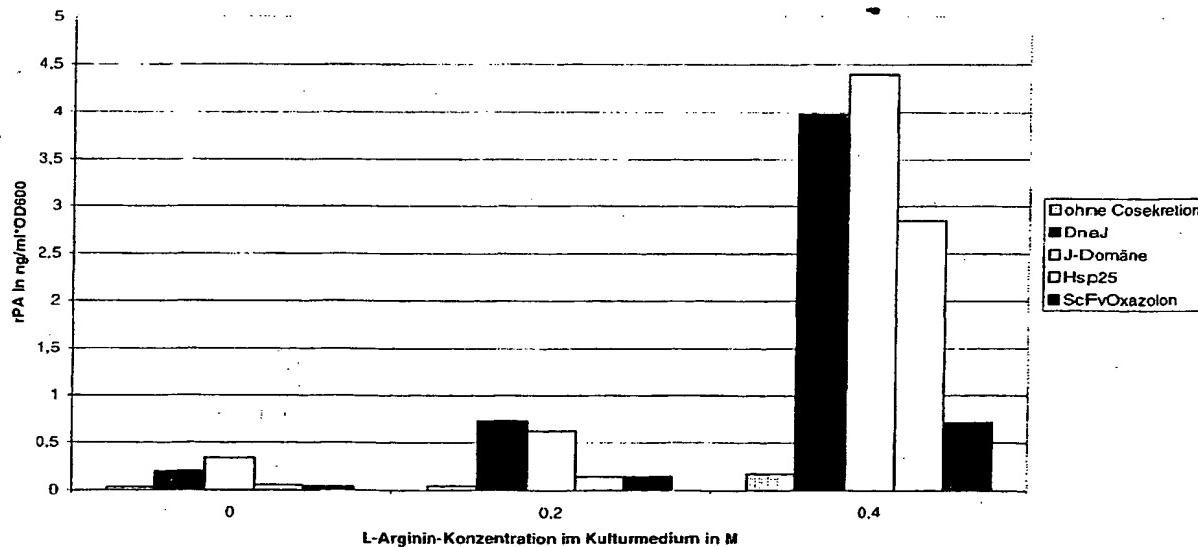
(74) Vertreter: Schreiner, Siegfried, Dr. et al
Roche Diagnostics GmbH,
Patent Department Pharma (TR-E),
P.O. Box 1152
82372 Penzberg (DE)

(54) Verfahren zur Herstellung von natürlich gefalteten und sekretierten Proteinen durch Co-Sekretion von Chaperonen

(57) Ein Verfahren zur Herstellung eines natürlich gefalteten eukaryontischen Polypeptids, enthaltend zwei oder mehrere über Disulfidbrücken verknüpfte Cysteine, durch a) Kultivierung prokaryontischer Zellen, wobei die genannten prokaryontischen Zellen einen Expressionsvektor enthalten, der für das genannte Polypeptid, das am N-Terminus eine prokaryontische Signalsequenz enthält, codiert, b) Sekretion des Polypep-

tids in das Periplasma oder das Medium, c) Abspaltung der Signalsequenz und Isolierung des Polypeptids aus dem Periplasma oder dem Medium, dadurch gekennzeichnet, daß in der genannten prokaryontischen Zelle zusätzlich eine für ein molekulares Chaperon codierende Nukleinsäure exprimiert und das Chaperon ins Periplasma sekretiert wird, ist zur rekombinanten Herstellung von Polypeptiden in Prokaryonten mit hoher Ausbeute geeignet.

Fig. 2



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von wasserlöslichen, natürlich gefalteten und sekretierten Polypeptiden nach Expression in prokaryontischen Zellen durch Co-Sekretion von molekularen Chaperonen.

[0002] In prokaryontischen Organismen findet die Proteinsynthese, auch Translation genannt, an den Ribosomen im Cytoplasma statt. Bei einer Expression rekombinanter DNA in prokaryontischen Wirtsorganismen ist es oft wünschenswert, daß das dabei erhaltene rekombinante Genprodukt bzw. Protein aus dem Cytoplasma durch die innere bakterielle Membran in den periplasmatischen Raum zwischen innerer und äußerer Membran sekretiert wird. Vom Periplasma können sekretierte Proteine dann z.B. durch einen osmotischen Schock in das Nährmedium freigesetzt werden. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, daß die sezernierten Polypeptide häufig nicht die native, biologisch aktive Konformation ausbilden (Hockney, TIBTECH 12 (1994) 456 - 463).

[0003] In jüngster Zeit wurden molekulare Chaperone und Faltungskatalysatoren, wie Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen oder Proteindisulfidisomerasen (Glockshuber et al., EP-A 0 510 658) eingesetzt, um die Ausbeute an nativem rekombinannten Protein bei der Faltung in vivo zu erhöhen (Thomas et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 66 (1997) 197-238). Dies führte teilweise zu erheblichen Verbesserungen bei der Expression z.B. von Ribulosebisphosphat-Carboxylase (RUBISCO; Goloubinoff et al., Nature 337 (1989) 44-47), humarer Procollagenäse (Lee & Ollins, J. Biol. Chem. 267 (1992) 2849-2852) oder neuronaler Stickstoffoxidsynthase aus Ratten (Roman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 8428-8432). In diesen Beispielen wurden GroEL/ES bzw. das DnaK-System aus E. coli im Cytosol co-überexprimiert.

[0004] Auch bei der Sekretion rekombinanter Proteine ins Periplasma von E. coli wurde die Co-Expression von Chaperone untersucht. Hier wurde jedoch nur eine cytosolische Überexpression von Chaperone erprobt, um die Sekretion ins Periplasma zu optimieren (Perez-Perez et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 210 (1995) 524-529; Sato et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 (1994) 258-264; Berges et al., Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996) 55-60). Bisherige Versuche zur Co-Sekretion in E. coli betrafen nur Faltungshelfer-Proteine, wie z. B. Proteindisulfidisomerase (PDI; Glockshuber et al., EP-A 0 510 658) oder Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen oder Dsb-Proteine (Knappik et al., Bio/Technology 11 (1993) 77-83; Qiu et al., Appl. Environm. Microbiol. 64 (1998) 4891-4896 und Schmidt et al., Prot. Engin. 11 (1998) 601 - 607).

[0005] Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung von wasserlöslichen, natürlich gefalteten eukaryontischen Polypeptiden nach Expression in Prokaryonten zur Verfügung zu stellen, welches auf einfache Weise durchführbar ist und bei dem eine aufwendige in vitro-Nachbehandlung, wie Auflösung von inclusion bodies, Reduktion und Naturierung, nicht erforderlich ist.

[0006] Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines natürlich gefalteten eukaryontischen Polypeptids, enthaltend zwei oder mehrere über Disulfidbrücken verknüpfte Cysteine, durch

- 35 a) Kultivierung prokaryontischer Zellen, wobei die genannten prokaryontischen Zellen einen Expressionsvektor enthalten, der für das genannte Polypeptid, das am N-Terminus eine prokaryontische Signalsequenz enthält, codiert,
- 40 b) Sekretion des Polypeptids in das Periplasma oder das Medium,
- c) Abspaltung der Signalsequenz und Isolierung des Polypeptids aus dem Periplasma oder dem Medium,

dadurch gekennzeichnet, daß in der genannten prokaryontischen Zelle zusätzlich eine für ein molekulares Chaperon codierende Nukleinsäure exprimiert und das Chaperon ins Periplasma sekretiert wird. Dabei ist es bevorzugt, daß das Chaperon überexprimiert wird.

[0007] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden dem zur Kultivierung der prokaryontischen Zellen verwendeten Nährmedium (Fermentationsmedium) zusätzlich reduzierende Thiolreagenzien, welche SH-Gruppen enthalten, zugesetzt, wobei die Ausbeute an rekombinant gewonnenem Protein weiter erhöht wird. Vorzugsweise werden 0,1-15 mmol/l Thiolreagenz zugesetzt. Erfindungsgemäß ist unter dem Begriff "Thiolreagenz" entweder ein reduzierendes (reduziertes) Thiolreagenz mit SH-Gruppen oder ein Gemisch von reduzierenden Thiolreagenzien mit SH-Gruppen und oxidierenden Thiolreagenzien mit Disulfidgruppen zu verstehen. Bevorzugte Substanzen sind reduziertes Glutathion (GSH), Cystein, N-Acetylcystein, Cysteamin, β-Mercaptoethanol und ähnliche Verbindungen. Die Thiolreagenzien können sowohl einzeln als auch in Gemischen verwendet werden. Besonders geeignet sind Thiolreagenzien wie beispielsweise Glutathion (GSH), die eine einzige SH-Gruppe pro Molekül aufweisen. Thiolreagenzien wie Glutathion, sind für die Verbesserung der Ausbeute nativ gefalteter Proteine bei der Expression rekombinanter DNA in prokaryontischen Zellen bekannt (Glockshuber et al., EP-A 0 510 658).

[0008] Unter Chaperonen gemäß der Erfindung sind Proteine zu verstehen, die andere, nicht-native Proteine in vivo vor Aggregation schützen und die Ausbildung ihrer nativen Konformation fördern. Molekulare Chaperone werden im

Stand der Technik eingesetzt, um Proteine zu stabilisieren und damit vor Aggregation und Inaktivierung zu schützen (Buchner et al., EP-A 0 556 726 A1). Vorzugsweise werden erfundungsgemäß ATP-unabhängige Chaperone des HSP40-Typs (Molmasse ca. 40 kDa) oder ein kleines Hitzeschockprotein (sHSP) verwendet. DnaJ ist ein 40 kDa Hitzeschockprotein, das im Cytoplasma von *E. coli* vorkommt und Teil des sogenannten Hsp70-Chaperonsystems ist (Bukau, B. & Horwich, A., Cell 92 (1998) 351-366). Zu diesem System gehören außerdem DnaK (Hsp70) und GrpE. Bestimmte Proteine werden durch das DnaK-System in einem ATP-abhängigen Prozeß zur nativen Konformation gefaltet (Schröder et al., EMBO J. 12 (1993) 4137-4144; Langer et al., Nature 356 (1992) 683 - 689). Zur Rückfaltung denaturierter Proteine benötigt dieses System zusätzlich ATP. DnaJ schützt in Abwesenheit von DnaK und ATP nicht-native Proteine vor Aggregation und vermittelt einen Faltungs-kompetenten Zustand (Schröder et al., EMBO J. 12 (1993) 4137-4144). Weiterhin bevorzugt ist die Co-Sekretion eines N-terminalen Fragments von DnaJ, das die Aminosäuren 1-108 umfaßt und im Folgenden als "J-Domäne" (Kelley, TIBS 23 (1998) 222-227) bezeichnet wird. In diesem Bereich befinden sich die J-Domäne und eine G/F-reiche Domäne, die Wechselwirkungen mit DnaK ausüben (Wall et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 2139-2144). Es wurde gezeigt, daß die Co-Expression von DnaJ im Cytosol zur Erhöhung der Ausbeute an löslichem Protein führen kann (Yokoyama et al., Microbiol. Ferment. Technol. 62 (1998) 1205-1210).

[0009] Hsp25 (z.B. aus der Maus) ist ein Vertreter der kleinen Hitzeschockproteine (Gaestel et al., Eur. J. Biochem. 179 (1989) 209-213), einer Klasse von Chaperonen, die ubiquitär verbreitet ist. Die Molmasse dieser Proteine liegt zwischen 15 und 30 kDa. Bei Hitzeschock werden die sHSPs in der Zelle stark angereichert (bis zu 1% des Gesamtzellproteins - Arrigo & Landry (1994), In Morimoto (Hrsg.): The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones, Cold Spring Harbour Press, 335-373). Wie DnaJ-Proteine besitzen sHSPs die Eigenschaft, die Aggregation von nichtnativen Proteinen zu verhindern und diese in einem faltungskompetenten Zustand zu halten (Jakob et al., J. Biol. Chem. 268 (1993) 1517-1520; Ehrsperger et al., EMBO J. 16 (1997) 221-229).

[0010] Der Begriff "Überexpression" gemäß vorliegender Erfindung bedeutet eine Steigerung der Expression der sekretierten Chaperone wie z.B. DnaJ- und Hsp25 (vorzugsweise um mindestens 100%) im Vergleich zur Expression im Wildtyp des jeweils verwendeten prokaryontischen Wirtsorganismus. Eine solche Überexpression läßt sich z.B. dadurch erreichen, daß sich die Gene (für das Protein, Chaperon und/oder Signalpeptid) unter Kontrolle eines starken prokaryontischen, vorzugsweise induzierbaren Expressionssignals (z.B. eines lac- oder T7-Promotors oder eines Derivates davon) befinden.

[0011] Das Sekretionskonstrukt für die Überexpression der Polypeptide (Proteine) samt regulatorischer Regionen (Promotor und Terminator) auf der rekombinanten DNA ist vorzugsweise in einem Vektor, welcher zusätzlich die in Prokaryonten seltene Arginin-tRNA_{AGA/AGG} codiert integriert oder wird mit einem Vektor, welcher diese tRNA codiert, co-exprimiert (Brinkmann et al., Gene 85 (1989) 109-114). Dies ermöglicht sowohl die Co-Überexpression der jeweiligen Proteine ins bakterielle Periplasma als auch die Transkription der seltenen tRNA^{Arg}_{AGA/AGG}, was eine erhöhte Synthese des gewünschten Proteins im bakteriellen Wirtsorganismus zur Folge hat. Die für das Polypeptide und das Chaperon codierenden Nukleinsäuren können auf einem Vektor oder auf zwei getrennten Vektoren lokalisiert sein.

[0012] Unter einer prokaryontischen Signalsequenz im Sinne der Erfindung ist ein Nukleinsäurefragment zu verstehen, welches aus Prokaryonten, vorzugsweise aus gramnegativen Bakterien, abgeleitet ist und das Durchdringen von an das Signalpeptid gebundenen Proteinen durch die inneren bakteriellen Membranen gewährleistet. Dadurch werden die Proteine im Periplasma bzw. im Zellüberstand lokalisiert. Solche Signalsequenzen haben üblicherweise eine Länge von 18 - 30 Aminosäuren und sind beispielsweise beschrieben in Murphy & Beckwith: Export of Proteins to the Cell Envelope in *Escherichia coli* und in Neidhardt et al. (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella*, Second Edition, Vol. 1, ASM Press, Washington, 1996, S. 967-978. Die Abspaltung von bakteriellen Signalsequenzen kann z.B. nach einer Sequenz Ala-X-Ala stattfinden (von Heijne et al., J. Mol. Biol. 184 (1985) 99-105). Die Struktur der bakteriellen Signalpeptidase ist beschrieben in Paetz et al., Nature 396 (1998) 186-190. Vorzugsweise werden Signalsequenzen verwendet, welche durch im Periplasma von prokaryontischen Zellen lokalisierten Proteasen vom gewünschten Protein wieder abgespalten werden. Alternativ kann durch Zugabe solcher Proteasen zum Zellüberstand oder zum isolierten Protein die Abspaltung der Signalsequenz erfolgen.

[0013] Mit dem erfundungsgemäßen Verfahren kann die heterologe Expression einer Vielzahl von eukaryontischen Proteinen wie z.B. Proteasen, Interferone, Proteinhormone, Antikörper oder Fragmenten davon verbessert werden. Besonders geeignet ist das Verfahren für die heterologe Herstellung von Proteinen, die im nativen Zustand mindestens zwei über eine Disulfidbrücke verknüpfte Cysteine enthalten und dann, wenn sie N-terminal keine fusionierte prokaryontische Signalsequenz besitzen, bei der prokaryontischen Expression als unlösliche inclusion bodies entstehen. Besonders geeignet ist das Verfahren für Proteine, die mehr als 5 Disulfidbrücken in nativem Zustand enthalten. Ein solches Protein ist beispielsweise ein rekombinanter Plasminogenaktivator (im folgenden rPA genannt, Martin et al., Cardiovasc. Drug Rev. 11 (1993) 299-311, US-Patent Nr. 5,223,256). rPA besitzt 9 Disulfidbrücken, die im reduzierten Cytosol von *E. coli* nicht ausgebildet werden.

[0014] Dabei wird die periplasmatische Lokalisation des Proteins und des Chaperons durch "operative Verknüpfung" mit einem Signalpeptid zum Durchdringen innerer bakterieller Membranen gewährleistet.

[0015] Zur Gewinnung des sekretorischen rPA-Proteins in funktionaler Form in *E. coli* wurde das Gen für dieses

Protein aus dem Plasmid pA27fd7 (Kohnert et al., Protein Engineering 5 (1992) 93-100) mit gentechnologischen Mitteln an eine prokaryotische Signalsequenz gramnegativer Bakterien, beispielsweise an die Signalsequenz von Pectatlyase B (PelB) von *Erwinia amylovora*, fusioniert. Die Genfusion wurde durch Klonierung in den Vektor pET20b(+) (Novagen Inc., Madison, USA) hergestellt. Damit unterliegt die Genexpression der Kontrolle des T7-Promoters. Die im Fusionsprotein vorhandene Signalsequenz bewirkt die Sekretion ins Periplasma. Während oder nach der Sekretion wird die Signalsequenz durch eine in der inneren Membran lokalisierte Peptidase abgespalten. Sezerniertes Protein kann dann im Periplasma falten. Die oxidierenden Bedingungen dieses Kompartiments ermöglichen die Ausbildung von Disulfidbrücken. Durch gleichzeitige Co-Überexpression von Chaperonen wie DnaJ, J-Domäne oder Hsp25 im Periplasma gelingt es, die Ausbeute an funktionalen Protein um mehr als das 100-fache zu steigern.

[0016] Weitere Beispiele von erfindungsgemäß herstellbaren Polypeptiden sind Antikörper oder Antikörperfragmente, beispielsweise ein Single-Chain Fv-Fragment (ScF_v , z.B. gegen das Schilddrüsen-stimulierende Hormon (thyroide stimulating hormone, TSH). ScF_v s sind verkürzte Antikörper, die nur aus den variablen Abschnitten (F_v) der schweren und leichten Kette eines Antikörpers bestehen, die über einen kurzen (meist Gly_4Ser_3) Linker künstlich fusioniert sind (Hudson, Curr. Opin Biotechnol. 9 (1998) 395-402). ScF_v s haben normalerweise die gleiche Affinität zum Antigen wie die paternalen F_v -Strände, können jedoch in *E. coli* überexprimiert werden. Da sie stabilisierende Intradomänen-Disulfidbrücken besitzen, die essentiell für die Stabilität sind, führt eine Expression im Cytosol meist zur Bildung von Inclusion Bodies (Übersichtsartikel: Shibui et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 (1992) 352-357). ScF_v s können durch Zufallsmutationen und anschließende Phage-Display-Selektion auf Bindung gewünschter Antigene gezielt optimiert werden (Übersichtsartikel: Allen et al., TIBS 20 (1995) 511-516).

[0017] Die folgenden Beispiele, Publikationen, das Sequenzprotokoll und die Abbildungen erläutern die Erfindung, deren Schutzausmaß sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Beschreibung des Sequenzprotokolls

[0018] SEQ ID NO: 1 und 2 zeigen die Sequenz des Teils des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-dnaJ, der für das Fusionsprotein aus OmpA-Signalsequenz und DnaJ codiert, zusammen mit den regulatorischen Sequenzen (Promotor, Terminator), die aus pIN III ompA3-dnaJ amplifiziert wurden.

[0019] SEQ ID NO: 3 und 4 zeigen die Sequenz des Teils des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-J-Domain, der für das Fusionsprotein aus OmpA-Signalsequenz und J-Domäne codiert, zusammen mit den regulatorischen Sequenzen (Promotor, Terminator), die aus pIN III ompA3-dnaJ amplifiziert wurden.

[0020] SEQ ID NO: 5 und 6 zeigen die Sequenz des Teils des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-hsp25, der für das Fusionsprotein aus OmpA-Signalsequenz und Hsp25 codiert, zusammen mit den regulatorischen Sequenzen (Promotor, Terminator), die aus pIN III ompA3-hsp25 amplifiziert wurden.

[0021] SEQ ID NO: 7 und 8 zeigen die Sequenz des Teils des Expressionsplasmides pUBS520-ScFvOx, der für das Fusionsprotein aus PelB-Signalsequenz und ScFvOxazolon codiert, zusammen mit den regulatorischen Sequenzen (Promotor, Terminator), die aus pHEN-ScFv bzw. pIN III ompA3 amplifiziert wurden.

[0022] SEQ ID NO: 9 und 10 zeigen die Sequenz des Teils des Expressionsplasmides pET20b(+-rPA, der für das Fusionsprotein aus PelB-Signalsequenz und rPA codiert.

Beschreibung der Figuren

[0023] Fig. 1 zeigt einen Western Blot der limitierten Proteolyse von periplasmatisch und cytosolisch exprimiertem DnaJ mit 50 µg/ml Trypsin zum Nachweis der zellulären Lokalisation und der nativen Faltung. Die Molgewichtsstandards wurden links und rechts aufgetragen. Zur Kontrolle wurde gereinigtes DnaJ (links) derselben Prozedur unterzogen, jedoch mit 6,25 µg/ml Trypsin.

[0024] Fig. 2 zeigt einen Vergleich der Expression von rPA im Periplasma von *E. coli* BL21(DE3) bei Co-Sekretion von DnaJ und bei Zusatz von GSH und verschiedenen niedermolekularen faltungsverbessernden Stoffen zum Medium.

[0025] Fig. 3 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-dnaJ.

[0026] Fig. 4 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-J-Domain.

[0027] Fig. 5 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-hsp25.

[0028] Fig. 6 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmides pUBS520-ScFvOx.

[0029] Fig. 7 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmides pET20b(+-rPA.

Allgemeines:

[0030] Zur periplasmatischen Überexpression von DnaJ, der J-Domäne sowie Hsp25 in *E. coli* wurde die DNA, die für diese Proteine codiert, mit gentechnologischen Mitteln an die Signalsequenz des Outer Membrane Proteins A

(OmpA) von *E. coli* fusioniert und die Fusion auf einem rekombinanten Plasmid unter Kontrolle des lac-Ipp-Promotors in *E. coli* exprimiert. Somit werden die Polypeptidkette von DnaJ und Hsp25 ins Periplasma des prokaryontischen Wirtsorganismus transportiert und dort nativ gefaltet. Die Lokalisation und native Faltung konnte dabei durch limitierte Proteolyse mit Trypsin und Western Blot nachgewiesen werden.

5

Beispiel 1:

Konstruktion des Expressionsplasmides pIN III omp A3-dnaJ

- 10 [0031] Molekulargenetische Techniken beruhten auf Ausubel et al. (Hrsg.), J. Wiley & Sons, 1997, Curr. Protocols of Molecular Biology. Oligonucleotide wurden von den Firmen MWG Biotech, Ebersberg oder GIBCO Life Sciences, Eggenstein, DE bezogen.
[0032] Das Gen, das für DnaJ codiert, Gene Bank Accession No. M 12565, wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und BamHI in das Expressionsplasmid pIN III ompA3 (Ghayreb et al., EMBO J. 3 (1984) 2437-2442) kloniert.
15 Die Sequenz des klonierten PCR-Fragments wurde durch Didesoxy-Sequenzierung (LiCor DNA-Sequencer 4000, MWG Biotech, Ebersberg) überprüft. Das resultierende Plasmid wurde pIN III ompA3-dnaJ bezeichnet. Die Sequenz des periplasmatisch exprimierten DnaJ unterscheidet sich von dem Wildtyp-Protein dahingehend, daß die Polypeptidsequenz mit Gly-Ile-Pro beginnt statt mit Met, es fand somit eine Verlängerung des N-Terminus um 2 Aminosäuren statt. DnaJ befindet sich damit unter Kontrolle des lac-Ipp-Promotors, der mit IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid)
20 induziert wird.

Beispiel 2:

Konstruktion des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-dnaJ

- 25 [0033] Mittels PCR wurde der Bereich aus dem Plasmid pIN III ompA3-dnaJ amplifiziert, der für das lac-Ipp Operon, die Signalsequenz, das dnaJ-Gen und die Terminator-Region des Operons codiert (SEQ ID NO: 1). Das PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuklease BgIII geschnitten und in den mit der Restriktionsendonuklease BamHI linearisierten Vektor pUBS520 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde pUBS520-pIN-dnaJ bezeichnet (Fig. 3).

30

Beispiel 3:

Konstruktion des Expressionsplasmides pUBS 520-pIN-J-Domain

- 35 [0034] Mittels des QuikChange-Mutagenese-Systems (Promega, Mannheim, DE) wurden im Plasmid pUBS 520-pIN-dnaJ nach dem Nukleotid 324 zwei Stop-Codone eingefügt, so daß nur noch die ersten 108 Aminosäuren exprimiert werden. Die Sequenz des mutagenisierten Bereiches wurde durch Didesoxy-Sequenzierung (LiCor DNA-Sequencer 4000, MWG Biotech, Ebersberg) und die Expression des verkürzten Proteinfragments durch Western Blotting und Detektion mit einem Anti-DnaJ-Antikörper nachgewiesen. Das entstandene Plasmid wurde mit pUBS 520-pIN-
40 J-Domain (Fig. 4) bezeichnet.

Beispiel 4:

Konstruktion des Expressionsplasmides pIN III ompA3-hsp25

- 45 [0035] Das Gen, das für Hsp25 codiert, Gene Bank Accession No.: L 07577, wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und BamHI in das Expressionsplasmid pIN III ompA3 (Ghayreb et al., EMBO J. 3 (1984) 2437-2442) kloniert. Die Sequenz des klonierten PCR-Fragments wurde durch Didesoxy-Sequenzierung (LiCor DNA-Sequencer 4000, MWG Biotech, Ebersberg) überprüft. Das resultierende Plasmid wurde pIN III ompA3-hsp25 bezeichnet. Die Sequenz des periplasmatisch exprimierten Hsp25 unterscheidet sich von dem Wildtyp-Protein dahingehend, daß die Polypeptidsequenz mit Gly-Ile-Leu beginnt statt mit Met, es fand somit eine Verlängerung des N-Terminus um 2 Aminosäuren statt. Hsp25 befindet sich damit unter Kontrolle des lac-Ipp-Promotors, der mit IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid)
50 induziert wird.

55

Beispiel 5:**Konstruktion des Expressionsplasmides pUBS520-pIN-hsp25**

5 [0036] Mittels PCR wurde der Bereich aus dem Plasmid pIN III ompA3-hsp25 amplifiziert, der für das lac-Ipp Operon, die Signalsequenz, das hsp25-Gen und die Terminator-Region des Operons codiert (SEQ ID NO: 5). Das PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuklease BgIII geschnitten und in den mit der Restriktionsendonuklease BamHI linearisierten Vektor pUBS520 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde pUBS520-pIN-hsp25 bezeichnet (Fig. 5).

10 Beispiel 6:**Konstruktion des Expressionsplasmides pUBS520-ScFvOx**

15 [0037] Als negativ-Kontrolle wurde die Co-Expression eines Single-Chain-Fv-Fragmentes, das gegen das Hapten Oxazolon gerichtet ist (ScFvOxazolon; Fiedler und Conrad, Bio/Technology 13 (1995) 1090-1093 untersucht, das keine Chaperon-Eigenschaften besitzt.

20 [0038] Mittels PCR wurde der Bereich aus dem Plasmid pHEN-ScFvOx amplifiziert, der für den lac-Promotor, die Signalsequenz pelB und das scfvox-Gen codiert. In einer zweiten PCR wurde der Bereich aus dem Plasmid pIN III ompA3 amplifiziert, der für den Ipp-Terminator codiert. In einer anschließenden PCR wurden die beiden Fragmente fusioniert. Das so entstandene PCR-Produkt (SEQ ID NO: 7) wurde mit der Restriktionsendonuklease BgIII geschnitten und in den mit der Restriktionsendonuklease BamHI linearisierten Vektor pUBS520 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde pUBS520-ScFvOx bezeichnet (Fig. 6).

25 Beispiel 7:**Konstruktion des Expressionsplasmides pET20b(+-rPA**

30 [0039] Mit Hilfe der PCR-Methode wurde das Gen eines Plasminogenaktivators (rPA) aus dem Plasmidvektor pA27fd7 (Kohnert et al., Protein Engineering 5 (1992) 93-100) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen Ncol und BamHI gespalten und in den Plasmidvektor pET20b(+) (Novagen Inc., Madison, USA) kloniert. Das Plasmid codiert für ein Fusionsprotein, welches aus der Signalsequenz von PelB (Pectatlyase aus Erwinia amylovora) und rPA besteht und die Sekretion von rPA ins Periplasma Didesoxy-Sequenzierung (LiCor DNA-Sequencer 4000, MWG Biotech, Ebersberg, DE) überprüft. Das Konstrukt wurde als pET20b(+-rPA bezeichnet (Fig. 7). In dem Plasmid wird rPA unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert, wobei die T7-RNA-Polymerase im Stamm *E. coli* BL21(DE3) der Kontrolle des lacUV5-Promotors unterliegt. Die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG. Das periplasmatisch exprimierte rPA unterscheidet sich von dem bei Kohnert et al beschriebenen Plasminogenaktivator durch Austausch der zweiten Aminosäure (Ser) gegen Ala.

40 Beispiel 8:**Funktionale Expression von rPA im Periplasma von *E. coli***

45 [0040] Eine stationäre Übernachtkultur von *E. coli* BL21(DE3) (Studier & Moffat, J. Mol. Biol. 189 (1986) 113-130), die mit pET20b(+-rPA und pUBS520-pIN-dnaJ transformiert wurde (Co-Expression von DnaJ), eine Übernachtkultur von *E. coli* BL21(DE3), die mit pET20b(+-rPA und pUBS520-pIN-J-Domain transformiert wurde (Co-Expression der J-Domäne), eine Übernachtkultur von *E. coli* BL21(DE3), die mit pET20b(+-rPA und pUBS520-pIN-hsp25 transformiert wurde (Co-Expression von Hsp25), eine Übernachtkultur von *E. coli* BL21(DE3), die mit pET20b(+-rPA und pUBS520-ScFvOx transformiert wurde (Co-Expression von ScFvOx), eine Übernachtkultur von *E. coli* BL21(DE3), die mit pET20b(+-rPA und pUBS520 transformiert wurde bzw. eine Übernachtkultur von *E. coli* BL21(DE3), die mit pET20b(+) und pUBS520 transformiert wurde (Kontrollkultur), wurde im Verhältnis 1:50 in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml, Fluka Chemica, Neu-Ulm, DE) verdünnt und bei 24°C und 170 rpm geschüttelt. Nach 3 h Wachstum wurden je 5ml der Kultur zu je 10 ml LB-Medium mit o.g. Mengen an Ampicillin und Kanamycin und verschiedenen Konzentrationen von GSH (0-10 mM, Fluka, DE) gegeben und mit jeweils 1mM IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid, AppliChem, Darmstadt, DE) induziert. Die Zellen wurden weitere 21 h bei 24 °C und 170 rpm geschüttelt und nach Bestimmung der OD₆₀₀ eine 1 ml-Probe genommen. Diese 1ml-Zellproben wurden nach einer modifizierten Vorschrift nach Jacobi et al. (J. Biol. Chem. 272 (1997) 21692-21699) in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen fraktioniert. Im Detail wurde das Zellpellet mit 500 µl Fraktionierungspuffer (150 mM NaCl (Roth GmbH), 50 mM Tris/HCl (Roth GmbH), 5mM EDTA (Biomol) und 1 mg/ml Polymyxin-B-Sulfat (Sigma), pH 7,5) versetzt, 1 h bei 10 °C

auf einem Eppendorf-Thermoschüttler bei 1400 rpm geschüttelt und dann 15 min bei 14 000 rpm in einer auf 10°C gekühlten Eppendorf-Mikrozentrifuge zentrifugiert, so daß eine Fraktion mit den löslichen periplasmatischen Proteinen (Überstand) und eine Restfraktion (Pellet) entstand.

5 [0041] Die Bestimmung von der Aktivität von rPA erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Verheijen et al. Thromb. Haemostasis 48 (1982) 266-269.

[0042] Alle ermittelten rPA-Konzentrationen in den Zellextrakten wurden auf Zellsuspensionen von $OD_{600}=1$ normiert, um den Fehler, der bei der Messung in verschiedenen Puffern auftritt, zu korrigieren. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1.

10

Tabelle 1:

Effekt von L-Arginin im Fermentationsmedium auf die Ausbildung von nativem rPA im Periplasma		
Co-sekretiertes Protein	rPA in ng/ml*OD_{600}	Stimulationsfaktor
-	0,030 ± 0,001	29
DnaJ	0,197 ± 0,019	29
J-Domäne	0,339 ± 0,007	16
Hsp25	0,053 ± 0,002	27
ScFvOxazolon (Kontrolle)	0,041 ± 0,003	13

[0043] Die Kultivierung erfolgte in Gegenwart von 5 mM GSH.

15
20
25**Beispiel 9:****Nachweis der periplasmatischen Lokalisation von DnaJ, das mittels pIN III ompA3 exprimiert wurde**

[0044] Um die periplasmatische Lokalisierung und korrekte Faltung von DnaJ, das mittels pIN III ompA3-dnaJ ins Periplasma sekretiert wurde, zu überprüfen, wurden Sphäroplasten präpariert. Dazu wurden E. coli XLI-Blue-Zellen, die mit pIN III ompA3-dnaJ transformiert waren, 1:50 aus einer stationären Vorkultur in LB-Medium (11 LB-Medium enthält 10 g Bacto-Trypton (Difco Factories, Detroit, Michigan, USA), 5 g Yeast-Extract (Difco Factories) und 5 g NaCl (Roth GmbH, Karlsruhe) mit 100 µg/ml Ampicillin (Sigma, Deisenhofen) verdünnt, bei 37°C und 200 rpm angezogen und nach 2,75 h (OD_{600} ca.0,5) mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3 h Wachstum in Anwesenheit des Induktors wurden die Zellen mittels Zentrifugation (Eppendorf-Mikrozentrifuge, 5000 rpm, 5 min) geerntet. Als Kontrolle wurde ein E. coli-Stamm, der ein Plasmid zur intrazellulären Überexpression von DnaJ enthält, kultiviert und 3 h induziert. Aus den nach Zentrifugation erhaltenen Zellpellets wurden Sphäroplasten folgendermaßen präpariert:

[0045] Das Äquivalent von 2 ml Bakterien, die einer OD_{600} von 1 entsprachen, wurde in einer 0,5 M Sucrose (ICN, Biomedicals, Eschwege)/0,2 M Tris/HCl/0,5 mM EDTA-(Biomol Feinchemikalien, Hamburg) Lösung (pH 8), mit 2 µg/ml Lysozym (Sigma, Deisenhofen) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben 5 min bei 15000 rpm in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge pelletiert und mit 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl (Roth GmbH), 1 mM EDTA, pH 8) gewaschen. Die als Pellet anfallenden Sphäroplasten wurden in 30 µl 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 100 mM NaCl aufgenommen. Als Kontrolle wurden Sphäroplasten in demselben Puffer, jedoch mit zusätzlich 0,1 % Triton®-X-100 (Amresco, Solon, Ohio, USA), aufgenommen. Für eine anschließende limitierte Proteolyse mit Trypsin wurden 15 µl der jeweiligen Sphäroplastenpräparation (mit bzw. ohne Triton®-X-100) mit 2 µl 1mg/ml Trypsin (Roche Diagnostics GmbH, DE) und 23 µl 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 100 mM NaCl gemischt und bei 20°C inkubiert. Nach 0,5 und 30 Minuten wurden je 8 µl Proben genommen, mit 2 µl 4 mg/ml Soybean-Trypsin-Inhibitor und 3 µl SDS-PAGE-Auftragsspuffer (4% Glycerin (Sigma, Deisenhofen), 0,5 % SDS (ICN), 2% Mercaptoethanol (Sigma), 0,0625 M Tris/HCl, pH 6,8 und Bromphenolblau (Sigma)) versetzt und 5 min gekocht. In einem Kontrollversuch wurden 2 µg gereinigtes DnaJ (2 µg/µl) mit 1 µl 100 µg/ml Trypsin und 14 µl 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 100 mM NaCl gemischt, bei 20°C inkubiert und die Proteolyse zu den angegebenen Zeitpunkten beendet. Die Proteolyseprodukte wurden durch SDS-PAGE nach Lämmlli et al., Nature 227 (1970) 680-685 aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrocellulosemembranen (BioRad Laboratories, München) übertragen (Khyse-Anderson, J. Biochem. Biophys. Methods 10 (1984) 203-207; Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1979) 267-271). Die Membranen wurden mit TBS-5% Milchpulver (Glücksklee, Nestlé Frankfurt) über Nacht geblockt und im Folgenden 2h mit Anti-DnaJ-Antikörper in TBS-5% Milchpulver für 2 h dekoriert. Nach 3 Waschschritten für jeweils 5 min in TBS wurde mit einem weiteren Antikörper (Anti-Rabbit-IgG-Peroxidase, Amersham Life Sciences, Braunschweig) in TBS-5% Milchpulver für 1,5 h inkubiert und wiederum 5x mit TBS-Puffer gewaschen. Zur Detektion wurde das ECL-Western-Blotting-Detection-Kit der Firma

Amersham verwendet. Das Ergebnis ist in Fig. 1 gezeigt. Da das sekretierte Chaperon nach Sphäroplastenpräparation Protease-sensitiv ist, wurde nachgewiesen, daß es auf der periplasmatischen Seite der inneren Membran lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu ist intrazelluläres DnaJ auch nach der Sphäroplastierung proteasegeschützt. Wurden die Sphäroplasten durch Triton-X-100 permeabilisiert, wird intrazelluläres DnaJ durch Trypsin verdaut. Das Spaltmuster des periplasmatisch exprimierten DnaJ ist identisch zu dem von gereinigtem, nativem DnaJ. Damit war nachgewiesen, daß das periplasmatische Expressionsprodukt in diesem Kompartiment nativ vorliegt.

Referenzliste

10 [0046]

- Allen et al., TIBS 20 (1995) 511-516
 Arrigo & Landry (1994) In Morimoto (Hrsg.): The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones, Cold Spring Harbour Press; 335-373
 Ausubel et al. (Hrsg.) Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley & Sons, 1997 Berges et al., Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996) 55-60
 Brinkmann et al., Gene 85 (1989) 109- 114
 Bukau, B. & Horwich, A., Cell 92 (1998) 351-366
 Ehrsperger et al., EMBO J. 16 (1997) 221-229
 EP-A 0 510 658
 EP-A 0 556 726
 Fiedler und Conrad, Bio/Technology 13 (1995) 1090- 1093
 Gaestel et al., Eur. J. Biochem. 179 (1989) 209-213
 Ghayreb et al., EMBO J. 3 (1984) 2437-2442
 Goloubinoff et al., Nature 337 (1989) 44-47
 Hockney, TIBTECH 12 (1994) 456 - 463
 Hudson, Curr. Opin Biotechnol. 9 (1998) 395-402
 Jacobi et al. (J. Biol. Chem. 272 (1997) 21692-21699
 Jakob et al., J. Biol. Chem. 268 (1993) 1517-1520
 Kelley, TIBS 23 (1998) 222-227
 Khyse-Anderson, J. Biochem. Biophys. Methods 10 (1984) 203-207
 Knappik et al., Bio/Technology 11 (1993) 77-83
 Kohnert et al., Protein Engineering 5 (1992) 93-100
 Lämmli et al., Nature 227 (1970) 680-685
 Langer et al., Nature 356 (1992) 683 - 689
 Lee & Olins, J. Biol. Chem. 267 (1992) 2849-2852
 Martin et al., Cardiovasc. Drug Rev. 11 (1993) 299-311
 Murphy & Beckwith: Export of Proteins to the Cell Envelope in Escherichia coli
 Neidhardt et al. (Hrsg.): Escherichia coli and Salmonella, Second Edition, Vol. 1, ASM Press, Washington, 1996,
 S. 967-978
 Paetzl et al., Nature 396 (1998) 186 - 190
 Perez-Perez et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 210 (1995) 524-529
 Qiu et al., Appl. Environm. Microbiol. 64 (1998) 4891 - 4896
 Roman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 8428-8432
 Sato et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 (1994) 258-264
 Schmidt et al., Prot. Engin. 11 (1998) 601- 607
 Schröder et al., EMBO J. 12 (1993) 4137-4144
 Shibui et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 (1992) 352 - 357
 Studier & Moffat, J. Mol. Biol. 189 (1986) 113-130
 Thomas et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 66 (1997) 197-238
 Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1979) 267-271
 US-Patent Nr. 5,223,256
 Verheijen et al. Thromb. Haemostasis 48 (1982) 266-269
 Wall et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 2139-2144
 Yokoyama et al., Microbiol. Ferment. Technol. 62 (1998) 1205-1210

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Verfahren zur Herstellung von natuerlich
 gefalteten und sekretierten Proteinen durch Co-Sekretion von
 molekularen Chaperonen
 10 <130> Case 20381
 <160> 10
 15 <210> 1
 <211> 1881
 <212> DNA
 <213> E. coli
 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (392) ... (1591)
 <400> 1
 25 TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTGGATAACC AGAAGCAATA AAAAATCAAA TCGGATTCA 60
 CTATATAATC TCACTTTATC TAAGATGAAT CCGATGGAAG CATCCTGTTT TCTCTCAATT 120
 30 TTTTTATCTA AAACCCAGCG TTGATGCTT CTTGAGCGA ACGATCAAAA ATAAGTGCCT 180
 TCCCCATCAAA AAAATATTCT CAACATAAAA AACTTTGTGT AATACTTGTA ACCTACATG 240
 GAGATTAAC CAATCTAGCT AGAGAGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT CGTATAATGT 300
 35 GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTACA CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGGAT 360
 TCACTGGAAC TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG 412
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala
 40 1 5
 ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GGA ATT 460
 Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Gly Ile
 10 15 20
 45 CCA GCT AAG CAA GAT TAT TAC GAG ATT TTA GGC GTT TCC AAA ACA GCG 508
 Pro Ala Lys Gln Asp Tyr Tyr Glu Ile Leu Gly Val Ser Lys Thr Ala
 25 30 35
 50 GAA GAG CGT GAA ATC AGA AAG GCC TAC AAA CGC CTG GCC ATG AAA TAC 556
 Glu Glu Arg Glu Ile Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Leu Ala Met Lys Tyr
 40 45 50 55
 55 CAC CCG GAC CGT AAC CAG GGT GAC AAA GAG GCC GAG GCG AAA TTT AAA 604
 His Pro Asp Arg Asn Gln Gly Asp Lys Glu Ala Glu Ala Lys Phe Lys
 60 65 70

EP 1 077 263 A1

	GAG ATC AAG GAA GCT TAT GAA GTT CTG ACC GAC TCG CAA AAA CGT GCG Glu Ile Lys Glu Ala Tyr Glu Val Leu Thr Asp Ser Gln Lys Arg Ala 75 80 85	652
5	GCA TAC GAT CAG TAT GGT CAT GCT GCG TTT GAG CAA GGT GCC ATG GGC Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala Phe Glu Gln Gly Gly Met Gly 90 95 100	700
10	GGC GGC GGT TTT GGC GGC GGC GCA GAC TTC AGC GAT ATT TTT GGT AAC Gly Gly Gly Phe Gly Gly Ala Asp Phe Ser Asp Ile Phe Gly Asp 105 110 115	748
15	GTT TTC GGC GAT ATT TTT GGC GGC GGA CGT GGT CGT CAA CGT GCG GCG Val Phe Gly Asp Ile Phe Gly Gly Arg Gly Arg Gln Arg Ala Ala 120 125 130 135	796
20	CGC GGT GCT GAT TTA CGC TAT AAC ATG GAG CTC ACC CTC GAA GAA GCT Arg Gly Ala Asp Leu Arg Tyr Asn Met Glu Leu Thr Leu Glu Glu Ala 140 145 150	844
	GTA CGT GGC GTG ACC AAA GAG ATC CGC ATT CCG ACT CTG GAA GAG TGT Val Arg Gly Val Thr Lys Glu Ile Arg Ile Pro Thr Leu Glu Glu Cys 155 160 165	892
25	GAC GTT TGC CAC GGT AGC GGT GCA AAA CCA GGT ACA CAG CCG CAG ACT Asp Val Cys His Gly Ser Gly Ala Lys Pro Gly Thr Gln Pro Gln Thr 170 175 180	940
30	TGT CCG ACC TGT CAT GGT TCT GGT CAG GTG CAG ATG CGC CAG GGA TTC Cys Pro Thr Cys His Gly Ser Gly Gln Val Gln Met Arg Gln Gly Phe 185 190 195	988
35	TTC GCT GTA CAG CAG ACC TGT CCA CAC TGT CAG GGC CGC GGT ACG CTG Phe Ala Val Gln Gln Thr Cys Pro His Cys Gln Gly Arg Gly Thr Leu 200 205 210 215	1036
	ATC AAA GAT CCG TGC AAC AAA TGT CAT GGT CAT GGT CGT GTT GAG CGC Ile Lys Asp Pro Cys Asn Lys Cys His Gly His Arg Val Glu Arg 220 225 230	1084
40	AGC AAA ACG CTG TCC GTT AAA ATC CCG GCA GGG GTG GAC ACT GGA GAC Ser Lys Thr Leu Ser Val Lys Ile Pro Ala Gly Val Asp Thr Gly Asp 235 240 245	1132
45	CGC ATC CGT CTT GCG GGC GAA GGT GAA GCG GGC GAG CAT GGC GCA CCG Arg Ile Arg Leu Ala Gly Glu Gly Ala Gly Glu His Gly Ala Pro 250 255 260	1180
50	GCA GGC GAT CTG TAC GTT CAG GTT AAA CAG CAC CCG ATT TTC Ala Gly Asp Leu Tyr Val Gln Val Gln His Pro Ile Phe 265 270 275	1228
55	GAG CGT GAA GGC AAC AAC CTG TAT TGC GAA GTC CCG ATC AAC TTC GCT Glu Arg Glu Gly Asn Asn Leu Tyr Cys Glu Val Pro Ile Asn Phe Ala 280 285 290 295	1276

EP 1 077 263 A1

ATG GCG GCG CTG GGT GGC GAA ATC GAA GTA CCG ACC CTT GAT GGT CGC Met Ala Ala Leu Gly Gly Glu Ile Glu Val Pro Thr Leu Asp Gly Arg 300 305 310	1324
5 GTC AAA CTG AAA GTG CCT GGC GAA ACC CAG ACC GGT AAG CTA TTC CGT Val Lys Leu Lys Val Pro Gly Glu Thr Gln Thr Gly Lys Leu Phe Arg 315 320 325	1372
10 ATG CGC GGT AAA GGC GTC AAG TCT GTC CGC GGT GGC GCA CAG GGT CAT Met Arg Gly Lys Gly Val Lys Ser Val Arg Gly Gly Ala Gln Gly Asp 330 335 340	1420
15 TTG CTG TGC CGC GTT GTC GTC GAA ACA CCG GTA GGC CTG AAC GAA AGG Leu Leu Cys Arg Val Val Glu Thr Pro Val Gly Leu Asn Glu Arg 345 350 355	1468
20 CAG AAA CAG CTG CTG CAA GAG CTG CAA GAA AGC TTC GGT GGC CCA ACC Gln Lys Gln Leu Leu Gln Glu Leu Gln Glu Ser Phe Gly Gly Pro Thr 360 365 370 375	1516
GGC GAG CAC AAC AGC CCG CGC TCA AAG AGC TTC TTT GAT GGT GTG AAG Gly Glu His Asn Ser Pro Arg Ser Lys Ser Phe Phe Asp Gly Val Lys 380 385 390	1564
25 AAG TTT TTT GAC GAC CTG ACC CGC TAA GGATCCGGCT GAGCAACGAC Lys Phe Phe Asp Asp Leu Thr Arg *	1611
30 395 400	
GTGAACGCAA TCGCTTCCGA CGTTCAAGGCT GCTAAAGATG ACGCAGCTCG TGCTAACAG	1671
CGTCTGGACA ACATGGCTAC TAAATACCGC AAGTAATAGT ACCTGTGAAG TGAAAAATGG	1731
35 CGCACATTGT GCGACATTTT TTTTGTCTGC CGTTTACCGC TACTGCGTCA CGCGTAACAT	1791
ATTCCCTTGC TCTGGTTCAC CATTCTGCCG TGACTCTACT GAAGGCGCAT TGCTGGCTGC	1851
GGGAGTTGCT CCACTGCTCA CCGAAACCGG	1881
40	
<210> 2	
<211> 400	
<212> PRT	
45 <213> E. coli	
<400> 2	
50 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala 1 5 10 15	
Thr Val Ala Gln Ala Gly Ile Pro Ala Lys Gln Asp Tyr Tyr Glu Ile 20 25 30	
55 Leu Gly Val Ser Lys Thr Ala Glu Glu Arg Glu Ile Arg Lys Ala Tyr 35 40 45	

Lys Arg Leu Ala Met Lys Tyr His Pro Asp Arg Asn Gln Gly Asp Lys
 50 55 60

5 Glu Ala Glu Ala Lys Phe Lys Glu Ile Lys Glu Ala Tyr Glu Val Leu
 65 70 75 80

Thr Asp Ser Gln Lys Arg Ala Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala
 85 90 95

10 Phe Glu Gln Gly Gly Met Gly Gly Phe Gly Gly Ala Asp
 100 105 110

Phe Ser Asp Ile Phe Gly Asp Val Phe Gly Asp Ile Phe Gly Gly
 115 120 125

15 Arg Gly Arg Gln Arg Ala Ala Arg Gly Ala Asp Leu Arg Tyr Asn Met
 130 135 140

20 Glu Leu Thr Leu Glu Glu Ala Val Arg Gly Val Thr Lys Glu Ile Arg
 145 150 155 160

Ile Pro Thr Leu Glu Glu Cys Asp Val Cys His Gly Ser Gly Ala Lys
 165 170 175

25 Pro Gly Thr Gln Pro Gln Thr Cys Pro Thr Cys His Gly Ser Gly Gln
 180 185 190

Val Gln Met Arg Gln Gly Phe Phe Ala Val Gln Gln Thr Cys Pro His
 30 195 200 205

Cys Gln Gly Arg Gly Thr Leu Ile Lys Asp Pro Cys Asn Lys Cys His
 210 215 220

Gly His Gly Arg Val Glu Arg Ser Lys Thr Leu Ser Val Lys Ile Pro
 35 225 230 235 240

Ala Gly Val Asp Thr Gly Asp Arg Ile Arg Leu Ala Gly Glu Gly Glu
 245 250 255

40 Ala Gly Glu His Gly Ala Pro Ala Gly Asp Leu Tyr Val Gln Val Gln
 260 265 270

Val Lys Gln His Pro Ile Phe Glu Arg Glu Gly Asn Asn Leu Tyr Cys
 45 275 280 285

Glu Val Pro Ile Asn Phe Ala Met Ala Ala Leu Gly Gly Glu Ile Glu
 290 295 300

50 Val Pro Thr Leu Asp Gly Arg Val Lys Leu Lys Val Pro Gly Glu Thr
 305 310 315 320

Gln Thr Gly Lys Leu Phe Arg Met Arg Gly Lys Gly Val Lys Ser Val
 325 330 335

55 Arg Gly Gly Ala Gln Gly Asp Leu Leu Cys Arg Val Val Val Glu Thr
 340 345 350

Pro Val Gly Leu Asn Glu Arg Gln Lys Gln Leu Leu Gln Glu Leu Gln
 355 360 365

5 Glu Ser Phe Gly Gly Pro Thr Gly Glu His Asn Ser Pro Arg Ser Lys
 370 375 380

Ser Phe Phe Asp Gly Val Lys Lys Phe Phe Asp Asp Leu Thr Arg *
 10 385 390 395 400

<210> 3
 15 <211> 1881
 <212> DNA
 <213> E. coli

<220>
 20 <221> CDS
 <222> (392) ... (790)

<400> 3

25 TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTGGATAACC AGAAGCAATA AAAAATCAA TCGGATTTC 60
 CTATATAATC TCACTTTATC TAAGATGAAT CCGATGGAAG CATCCTGTTT TCTCTCAATT 120
 TTTTTATCTA AAACCCAGCG TTCGATGCCTT CTTTGAGCGA ACGATCAAAA ATAAGTGCCT 180
 30 TCCCCATCAA AAAATAITCT CAACATAAAA AACTTTGTGT AATACTTGTAA CGCTACATG 240
 GAGATTAACT CAATCTAGCT AGAGAGGCCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT CGTATAATGT 300
 35 GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCACA CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGGAT 360
 TCACTGGAAC TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG 412
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala
 1 5

40 ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GGA ATT 460
 Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Gly Ile
 10 15 20

45 CCA GCT AAG CAA GAT TAT TAC GAG ATT TTA GGC GTT TCC AAA ACA GCG 508
 Pro Ala Lys Gln Asp Tyr Tyr Glu Ile Leu Gly Val Ser Lys Thr Ala
 25 30 35

50 GAA GAG CGT GAA ATC AGA AAG GCC TAC AAA CGC CTG GCC ATG AAA TAC 556
 Glu Glu Arg Glu Ile Arg Lys Ala Tyr Lys Arg Leu Ala Met Lys Tyr
 40 45 50 55

CAC CCG GAC CGT AAC CAG GGT GAC AAA GAG GCC GAG GCG AAA TTT AAA 604
 His Pro Asp Arg Asn Gln Gly Asp Lys Glu Ala Glu Ala Lys Phe Lys
 55 60 65 70

EP 1 077 263 A1

	GAG ATC AAG GAA GCT TAT GAA GTT CTG ACC GAC TCG CAA AAA CGT GCG Glu Ile Lys Glu Ala Tyr Glu Val Leu Thr Asp Ser Gln Lys Arg Ala	652
5	75 80 85	
	GCA TAC GAT CAG TAT GGT CAT GCT GCG TTT GAG CAA GGT GGC ATG GGC Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala Phe Glu Gln Gly Gly Met Gly	700
	90 95 100	
10	GGC GGC GGT TTT GGC GGC GGC GCA GAC TTC AGC GAT ATT TTT GGT GAC Gly Gly Gly Phe Gly Gly Ala Asp Phe Ser Asp Ile Phe Gly Asp	748
	105 110 115	
15	GTT TTC GGC GAT ATT TTT GGC GGC GGA CGT GGT CGT TAA TAG Val Phe Gly Asp Ile Phe Gly Gly Arg Gly Arg * *	790
	120 125 130	
	GCGGCCGCG GTGCTGATTT ACGCTATAAC ATGGAGCTCA CCCTCGAAGA AGCTGTACGT	850
20	GGCGTGACCA AAGAGATCCG CATTCCGACT CTGGAAGAGT GTGACGTTG CCACGGTAGC GGTGCAAAAC CAGGTACACA GCCGCAGACT TGTCGACCT GTCATGGTTC TGGTCAGGTG	910
	CAGATGCGCC AGGGATTCTT CGCTGTACAG CAGACCTGTC CACACTGTCA GGGCGCGGT	970
25	ACGCTGATCA AAGATCCGT CAACAAATGT CATGGTCATG GTCGTGTTGA GCGCAGCAAA ACGCTGTCCG TTAAAATCCC GGCAAGGGTG GACACTGGAG ACCGCATCCG TCTTGCGGGC	1030
	GAAGGTGAAG CGGGCGAGCA TGGCGCACCG GCAGGGGATC TGTACGTTCA GGTCAGGTT	1090
30	AAACAGCACC CGATTTTCGA GCGTGAAGGC AACAAACCTGT ATTGCGAAGT CCCGATCAAC TTCGCTATGG CGGGCGCTGGG TGGCGAAATC GAAGTACCGA CCCTTGATGG TCGCGTCAAA	1150
	CTGAAAATGTC CCAGACCGGT AAGCTATTCC GTATGCGCGG TAAAGGCGTC AAGTCTGTCC GCGGTGGCGC ACAGGGTGAT TTGCTGTGCC GCGTTGTCGT CGAACACACCG	1210
35	GTAGGCCTGA ACGAAAGGCA GAAACAGCTG CTGCAAGAGC TGCAAGAAAG CTTCGGTGGC CCAACCGGGCG AGCACAACAG CCCGCGCTCA AAGAGCTTCT TTGATGGTGT GAAGAAGTTT	1270
	TTTGACGACC TGACCCGCTA AGGATCCGGC TGAGCAACGA CGTGAACGCA ATGCGTTCCG	1330
40	ACGTTCAGGC TGCTAAAGAT GACGCAGCTC GTGCTAACCA GCGTCTGGAC AACATGGCTA CTAAATACCG CAAGTAATAG TACCTGTGAA GTGAAAAATG GCGCACATTG TGCGACATTG	1390
	TTTTTGCTCG CCGTTTACCG CTACTGCGTC ACGCGTAACA TATTCCCTTG CTCTGGTTCA	1450
45	CCATTCTGCG CTGACTCTAC TGAAGGGCGCA TTGCTGGCTG CGGGAGTTGC TCCACTGCTC	1510
	ACCGAAACCG G	1570
50		1630
		1690
		1750
		1810
		1870
		1881

5
<210> 4
<211> 133
<212> PRT
<213> E. coli

10
<400> 4

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 .. 15

Thr Val Ala Gln Ala Gly Ile Pro Ala Lys Gln Asp Tyr Tyr Glu Ile
20 25 30

15 Leu Gly Val Ser Lys Thr Ala Glu Glu Arg Glu Ile Arg Lys Ala Tyr
35 40 45

Lys Arg Leu Ala Met Lys Tyr His Pro Asp Arg Asn Gln Gly Asp Lys
50 55 60

20 Glu Ala Glu Ala Lys Phe Lys Glu Ile Lys Glu Ala Tyr Glu Val Leu
65 70 75 80

25 Thr Asp Ser Gln Lys Arg Ala Ala Tyr Asp Gln Tyr Gly His Ala Ala
85 90 95

Phe Glu Gln Gly Met Gly Gly Phe Gly Gly Ala Asp
100 105 110

30 Phe Ser Asp Ile Phe Gly Asp Val Phe Gly Asp Ile Phe Gly Gly
115 120 125

Arg Gly Arg * *
130

35
<210> 5
<211> 1379
<212> DNA
40 <213> E. coli

45 <220>
<221> CDS
<222> (392) ... (1090)

<400> 5

TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTGGATAACC AGAACATAA AAAAATCAAA TCGGATTCA 60

50 CTATATAATC TCACTTTATC TAAGATGAAT CCGATGGAAG CATCCTGTT TCTCTCAATT 120

TTTTTATCTA AAACCCAGCG TTTCGATGCTT CTTTGAGCGA ACGATCAAA ATAAGTGCCT 180

TCCCCATCAAA AAAATATTCT CAACATAAAA AACTTTGTGT AATACTTGTA ACGCTACATG 240

55 GAGATTAACT CAATCTAGCT AGAGAGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT CGTATAATGT 300

	GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCACA CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGGAT	360
5	TCACTGGAAC TCTAGATAAC GAGGGCAAAA A ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala 1 5	412
10	ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCC GGA ATT Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Gly Ile 10 15 20	460
15	CTC ACC GAG CGC CGC GTG CCC TTC TCG CTG CTG CCG AGC CCG AGC TGG Leu Thr Glu Arg Arg Val Pro Phe Ser Leu Leu Arg Ser Pro Ser Trp 25 30 35	508
20	GAA CCA TTC CGG GAC TGG TAC CCT GCA CAC AGC CGC CTC TTC GAT CAA Glu Pro Phe Arg Asp Trp Tyr Pro Ala His Ser Arg Leu Phe Asp Gln 40 45 50 55	556
25	GCT TTC CGG GTG CCC CGG TTG CCC GAT GAG TGG TCG CAG TGG TTC AGC Ala Phe Gly Val Pro Arg Leu Pro Asp Glu Trp Ser Gln Trp Phe Ser 60 65 70	604
30	GCC GCT CGG TGG CCC CGA TAC GTG CGC CCG CTG CCC GCC GCG ACC GCC Ala Ala Gly Trp Pro Gly Tyr Val Arg Pro Leu Pro Ala Ala Thr Ala 75 80 85	652
35	GAG GGC CCC GCG GCG GTG ACC CTG GCC GCA CCA GCC TTC AGC CGA GCG Glu Gly Pro Ala Ala Val Thr Leu Ala Ala Pro Ala Phe Ser Arg Ala 90 95 100	700
40	CTC AAC CGA CAG CTC AGC AGC GGG GTC TCG GAG ATC CGA CAG ACG GCT Leu Asn Arg Gln Leu Ser Ser Gly Val Ser Glu Ile Arg Gln Thr Ala 105 110 115	748
45	GAT CGC TGG CGC GTG TCC CTG GAC GTC AAC CAC TTC GCT CCG GAG GAG Asp Arg Trp Arg Val Ser Leu Asp Val Asn His Phe Ala Pro Glu Glu 120 125 130 135	796
50	CTC ACA GTG AAG ACC AAG GAA GGC GTG GTG GAG ATC ACT GGC AAG CAC Leu Thr Val Lys Thr Lys Glu Gly Val Val Glu Ile Thr Gly Lys His 140 145 150	844
55	GAA GAA AGG CAG GAC GAA CAT GGC TAC ATC TCT CGG TGC TTC ACC CGG Glu Glu Arg Gln Asp Glu His Gly Tyr Ile Ser Arg Cys Phe Thr Arg 155 160 165	892
	AAA TAC ACG CTC CCT CCA GGT GTG GAC CCC ACC CTA GTG TCC TCT TCC Lys Tyr Thr Leu Pro Pro Gly Val Asp Pro Thr Leu Val Ser Ser Ser 170 175 180	940
	CTA TCC CCT GAG GGC ACA CTT ACC GTG GAG GCT CCG TTG CCC AAA GCA Leu Ser Pro Glu Gly Thr Leu Thr Val Glu Ala Pro Leu Pro Lys Ala 185 190 195	988

EP 1 077 263 A1

200	205	210	215	1036
5				
220	225	230		1084
10				
225	230			
15				
CTAAAGATGA CGCAGCTCGT GCTAACCAACGACTA CATGGCTACT AAATACCGCA				1200
AGTAATAGTA CCTGTGAAGT GAAAAATGGC GCACATTGTG CGACATTTTT TTTGTCTGCC				1260
20				
GTTCACCGCT ACTGCGTCAC GCGTAACATA TTCCCTTGCT CTGGTTCAACC ATTCTGCGCT				1320
25				
GACTCTACTG AAGGCGCATT GCTGGCTGCG GGAGTTGCTC CACTGCTCAC CGAAACCGG				1379
<210>	6			
<211>	233			
<212>	PRT			
<213>	E. coli			
30				
<400>	6			
35				
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala				
1	5	10	15	
40				
Thr Val Ala Gln Ala Gly Ile Leu Thr Glu Arg Arg Val Pro Phe Ser				
20	25	30		
45				
Leu Leu Arg Ser Pro Ser Trp Glu Pro Phe Arg Asp Trp Tyr Pro Ala				
35	40	45		
50				
His Ser Arg Leu Phe Asp Gln Ala Phe Gly Val Pro Arg Leu Pro Asp				
50	55	60		
55				
Glu Trp Ser Gln Trp Phe Ser Ala Ala Gly Trp Pro Gly Tyr Val Arg				
65	70	75	80	
60				
65				
70				
75				
80				
85				
90				
95				
100				
105				
110				
115				
120				
125				
130				
135				
140				

EP 1 077 263 A1

Val Glu Ile Thr Gly Lys His Glu Glu Arg Gln Asp Glu His Gly Tyr
 145 150 155 160

5 Ile Ser Arg Cys Phe Thr Arg Lys Tyr Thr Leu Pro Pro Gly Val Asp
 165 170 175

Pro Thr Leu Val Ser Ser Ser Leu Ser Pro Glu Gly Thr Leu Thr Val
 180 185 190

10 Glu Ala Pro Leu Pro Lys Ala Val Thr Gln Ser Ala Glu Ile Thr Ile
 195 200 205

Pro Val Thr Phe Glu Ala Arg Ala Gln Ile Gly Gly Pro Glu Ala Gly
 15 210 215 220

Lys Ser Glu Gln Ser Gly Ala Lys *
 225 230

20 <210> 7
 <211> 1256
 <212> DNA
 <213> E. coli

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (199)...(969)

30 <400> 7
 GATCTGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT CGTATGTTGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA 60
 CAATTTACA CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGCCA AGCTTGATG CAAATTCTAT 120

35 TTCAAGGAGA CAGTCATAAT GAAATACCTA TTGCTACGG CAGCCGCTGG ATTGTTATTA 180
 CTCGCAGGCC AGCCGGCC ATG GCC GAG GTC AAG CTG CAG GAG TCT GGG CGA 231
 Met Ala Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly
 1 5 10

40 GGC TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CGG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT 279
 Gly Leu Val Gln Pro Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 15 20 25

45 GGA TTC ACT TTC AGT AGC TTT GGA ATG CAC TGG GTT CGT CAG GCT CCA 327
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 30 35 40

50 GAG AAG GGG CTG GAG TGG GTC GCA TAT ATT AGT AGT GGC AGT AGT ACC 375
 Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr
 45 50 55

55 ATC TAC TAT GCA GAC ACA GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC 423
 Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 60 65 70 75

EP 1 077 263 A1

AAT CCC AAC AAC ACC CTG TTC CTG CAA ATG ACC AGT CTA AGG TCT GAG Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu 80 85 90	471
5 GAC ACG GCC ATG TAT TAC TGC GCA AGA GAT TAC GGG GCT TAT TGG GGC Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Ala Tyr Trp Gly 95 100 105	519
10 CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GSA Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly 110 115 120	567
15 GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro 125 130 135	615
20 GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser 140 145 150 155	663
25 GCC AGT TCA AGT GTA AGG TAC ATG AAC TGG TTC CAA CAG AAG TCA GGC Ala Ser Ser Val Arg Tyr Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly 160 165 170	711
30 ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC AAA CTG TCT TCT GGA Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ser Ser Gly 175 180 185	759
35 GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu 190 195 200	807
40 ACA ATC AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln 205 210 215	855
45 CAG TGG AGT AGT AAT CCA CTC ACT TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu 220 225 230 235	903
50 CTG AAA CGG GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG Leu Lys Arg Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu 240 245 250	951
55 AAT GGG GCC GCA TAG TAA CTGAGCAACG ACGTGAACGC AATGCGTTCC Asn Gly Ala Ala * * 255	999
GACGTTCAAGG CTGCTAAAGA TGACGCAGCT CGTGCTAACCC AGCGTCTGGCA CAACATGGCT 50 ACTAAAATACC GCAAGTAATA GTACCTGTGA AGTGAAAAAT GGCGCACATT GTGCGACATT TTTTTTGTCT GCCGTTTACCC GCTACTGCGT CACCGCGTAAC ATATTCCCTT GCTCTGGTTC 55 ACCATTCTGCA GCTGACTCTA CTGAAGGGCGC ATTGCTGGCT GCGGGAGTTG CTCCACTGCT	1059 1119 1179 1239

CACCGAAACC GGAGATC

1256

5 <210> 8
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> E. coli

10 <400> 8

Met Ala Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

15 Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

20 Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

25 Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

30 Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala
 130 135 140

35 Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 145 150 155 160

40 Arg Tyr Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg
 165 170 175

45 Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
 180 185 190

50 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met
 195 200 205

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
 210 215 220

55 Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Ala
 225 230 235 240

Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala *
 245 250 255

5

*

<210> 9
 10 <211> 1137
 <212> DNA
 <213> E. coli

<220>
 15 <221> CDS
 <222> (1)...(1137)

<400> 9

20	ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC GCT Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala 1 5 10 15	48
25	GCC CAG CCG GCG ATG GCC ATG GCT TAC CAA GGA AAC AGT GAC TGC TAC Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ala Tyr Gln Gly Asn Ser Asp Cys Tyr 20 25 30	96
30	TTT GGG AAT GGG TCA GCC TAC CGT GGC ACG CAC AGC CTC ACC GAG TCG Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser 35 40 45	144
35	GGT GCC TCC TGC CTC CCG TGG AAT TCC ATG ATC CTG ATA GGC AAG GTT Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val 50 55 60	192
40	TAC ACA GCA CAG AAC CCC AGT GCC CAG GCA CTG GGC CTG GGC AAA CAT Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His 65 70 75 80	240
45	AAT TAC TGC CGG AAT CCT GAT GGG GAT GCC AAG CCC TGG TGC CAC GTG Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val 85 90 95	288
50	CTG ACG AAC CGC AGG CTG ACG TGG GAG TAC TGT GAT GTG CCC TCC TGC Leu Thr Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys 100 105 110	336
55	TCC ACC TGC GGC CTG AGA CAG TAC AGC CAG CCT CAG TTT CGC ATC AAA Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys 115 120 125	384
	GGA GGG CTC TTC GCC GAC ATC GCC TCC CAC CCC TGG CAG GCT GCC ATC Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile 130 135 140	432

55

EP 1 077 263 A1

	TTT GCC AAG CAC AGG AGG TCG CCC GGA GAG CGG TTC CTG TCC GGG GGC Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly 145 150 155 160	480
5	ATA CTC ATC AGC TCC TGC TGG ATT CTC TCT GCC GCC CAC TGC TTC CAG Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln 165 170 175	528
10	GAG AGG TTT CCG CCC CAC CAC CTG ACG GTG ATC TTG GGC AGA ACA FAC Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr 180 185 190	576
15	CGG GTG GTC CCT GGC GAG GAG CAG AAA TTT GAA GTC GAA AAA TAC Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr 195 200 205	624
20	ATT GTC CAT AAG GAA TTC GAT GAT GAC ACT TAC GAC AAT GAC ATT GCG Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala 210 215 220	672
25	CTG CTG CAG CTG AAA TCG GAT TCG TCC CGC TGT GCC CAG GAG AGC AGC Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser 225 230 235 240	720
30	GTG GTC CGC ACT GTG TGC CTT CCC CCG GCG GAC CTG CAG CTG CCG GAC Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp 245 250 255	768
35	TGG ACG GAG TGT GAG CTC TCC GGC TAC GGC AAG CAT GAG GCC TTG TCT Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser 260 265 270	816
40	CCT TTC TAT TCG GAG CGG CTG AAG GAG GCT CAT GTC AGA CTG TAC CCA Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro 275 280 285	864
45	TCC AGC CGC TGC ACA TCA CAA CAT TTA CTT AAC AGA ACA GTC ACC ACC GAC Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp 290 295 300	912
50	AAC ATG CTG TGT GCT GGA GAC ACT CGG AGC GGC GGG CCC CAG GCA AAC Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn 305 310 315 320	960
55	TTG CAC GAC GCC TGC CAG GGC GAT TCG GGA GGC CCC CTG GTG TGT CTG Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu 325 330 335	1008
	AAC GAT GGC CGC ATG ACT TTG GTG GGC ATC ATC AGC TGG GGC CTG GGC Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly 340 345 350	1056
	TGT GGA CAG AAG GAT GTC CCG GGT GTG TAC ACC AAG GTT ACC AAC TAC Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr 355 360 365	1104

CTA GAC TGG ATT CGT GAC AAC ATG CGA CCG TGA
 Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro *
 370 375

1137

5

<210> 10
 <211> 379
 10 <212> PRT
 <213> E. coli

 <400> 10

15 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

 Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ala Tyr Gln Gly Asn Ser Asp Cys Tyr
 20 25 30

 20 Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser
 35 40 45

 Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val
 25 50 55 60

 Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His
 65 70 75 80

 30 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val
 85 90 95

 Leu Thr Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys
 100 105 110

 35 Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys
 115 120 125

 Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile
 40 130 135 140

 Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly
 145 150 155 160

 Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln
 45 165 170 175

 Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr
 180 185 190

 50 Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr
 195 200 205

 Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala
 55 210 215 220

Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser
 225 230 235 240
 5 Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp
 245 250 255
 Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser
 10 260 265 270
 Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro
 275 280 285
 15 Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp
 290 295 300
 Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn
 20 305 310 315 320
 Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu
 325 330 335
 25 Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly
 340 345 350
 Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr
 355 360 365
 30 Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro *
 370 375

35

Patentansprüche

- 40 1. Verfahren zur Herstellung eines natürlich gefalteten eukaryontischen Polypeptids, enthaltend zwei oder mehrere
 über Disulfidbrücken verknüpfte Cysteine, durch
- 45 a) Kultivierung prokaryontischer Zellen, wobei die genannten prokaryontischen Zellen einen Expressionsvektor
 enthalten, der für das genannte Polypeptid, das am N-Terminus eine prokaryotische Signalsequenz ent-
 hält, codiert,
- b) Sekretion des Polypeptids in das Periplasma oder das Medium,
- c) Abspaltung der Signalsequenz und Isolierung des Polypeptids aus dem Periplasma oder dem Medium,
 50 dadurch gekennzeichnet, daß in der genannten prokaryontischen Zelle zusätzlich eine für ein molekulares Chaperon codierende Nukleinsäure exprimiert und das Chaperon ins Periplasma sekretiert wird.
- 55 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Chaperon DNAJ oder HSP25 verwendet wird.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß dem Nährmedium ein reduzierendes Thiol-
 reagenz zugesetzt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß als reduzierendes Thiolreagenz Glutathion (GSH) verwendet wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Signalsequenz aus gramnegativen Bakterien stammt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die für das molekulare Chaperon codierende Nukleinsäure und die für das Polypeptid codierende Nukleinsäure auf zwei getrennten Vektoren lokalisiert sind.
- 10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die für das molekulare Chaperon codierende Nukleinsäure auf dem Expressionsvektor, welcher auch die für das Polypeptide codierende Nukleinsäure enthält, lokalisiert ist.
- 15 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die für das molekulare Chaperon codierende rekombinante DNA in operativer Verknüpfung mit einem DNA-Fragment steht, das ein Signalpeptid zum Durchdringen der inneren bakteriellen Membran codiert.
- 20 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß sich die für das sekretierte molekulare Chaperon und/oder für das sekretierte Protein codierende DNA unter Kontrolle eines induzierbaren Expressionssignals befindet.
- 25 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid ein Antikörper, Antikörperfragment, Interferon, Proteinhormon oder eine Protease ist.

25

30

35

40

45

50

55

Fig. 1

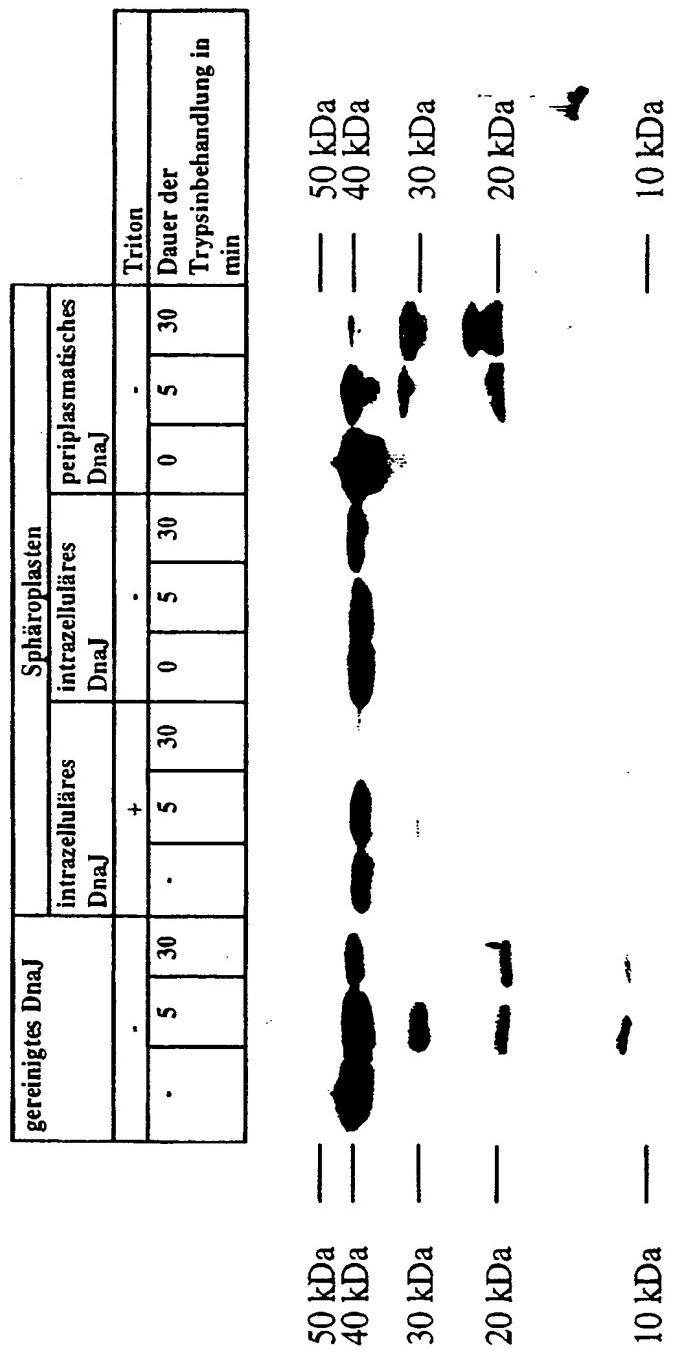


Fig. 2

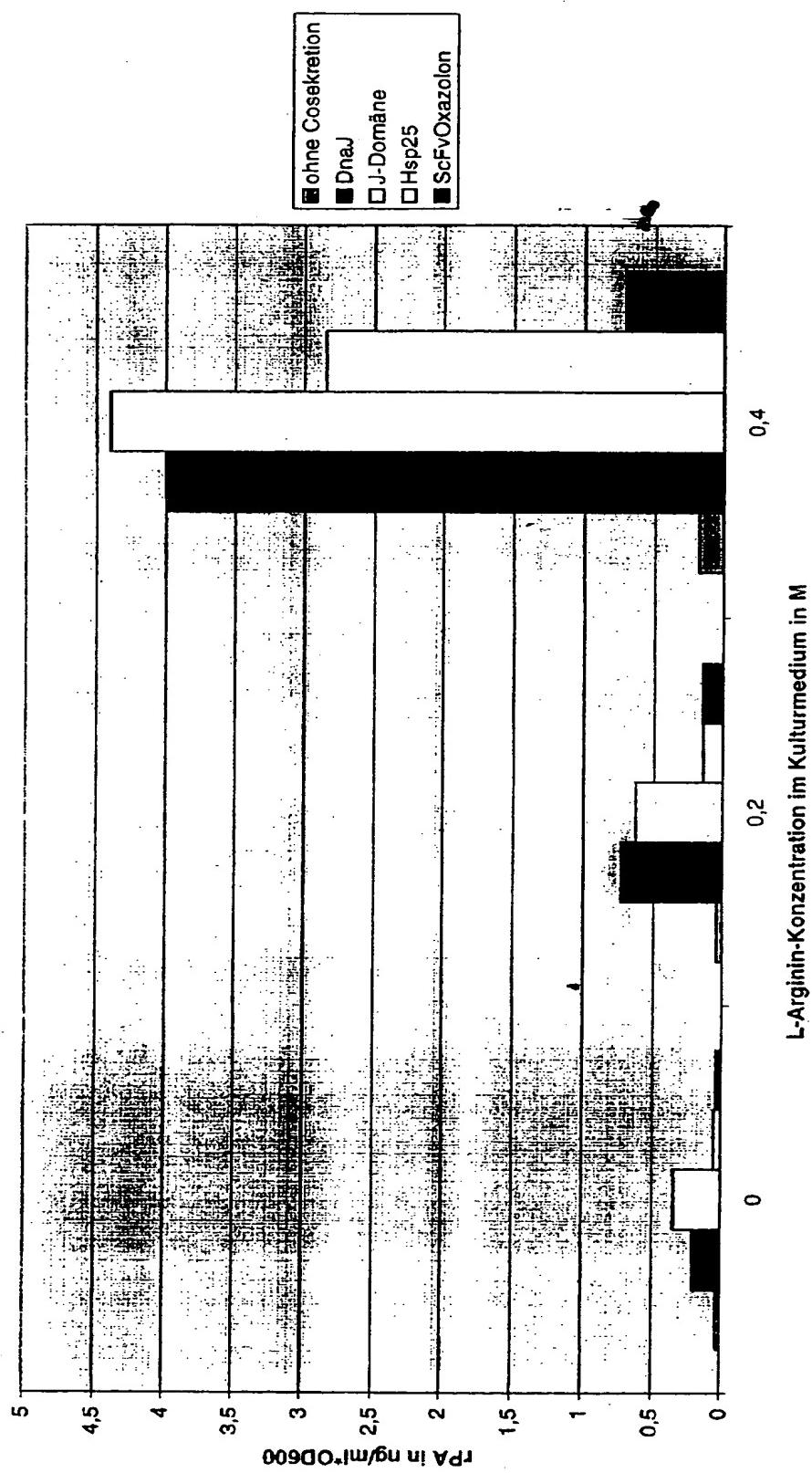


Fig. 3

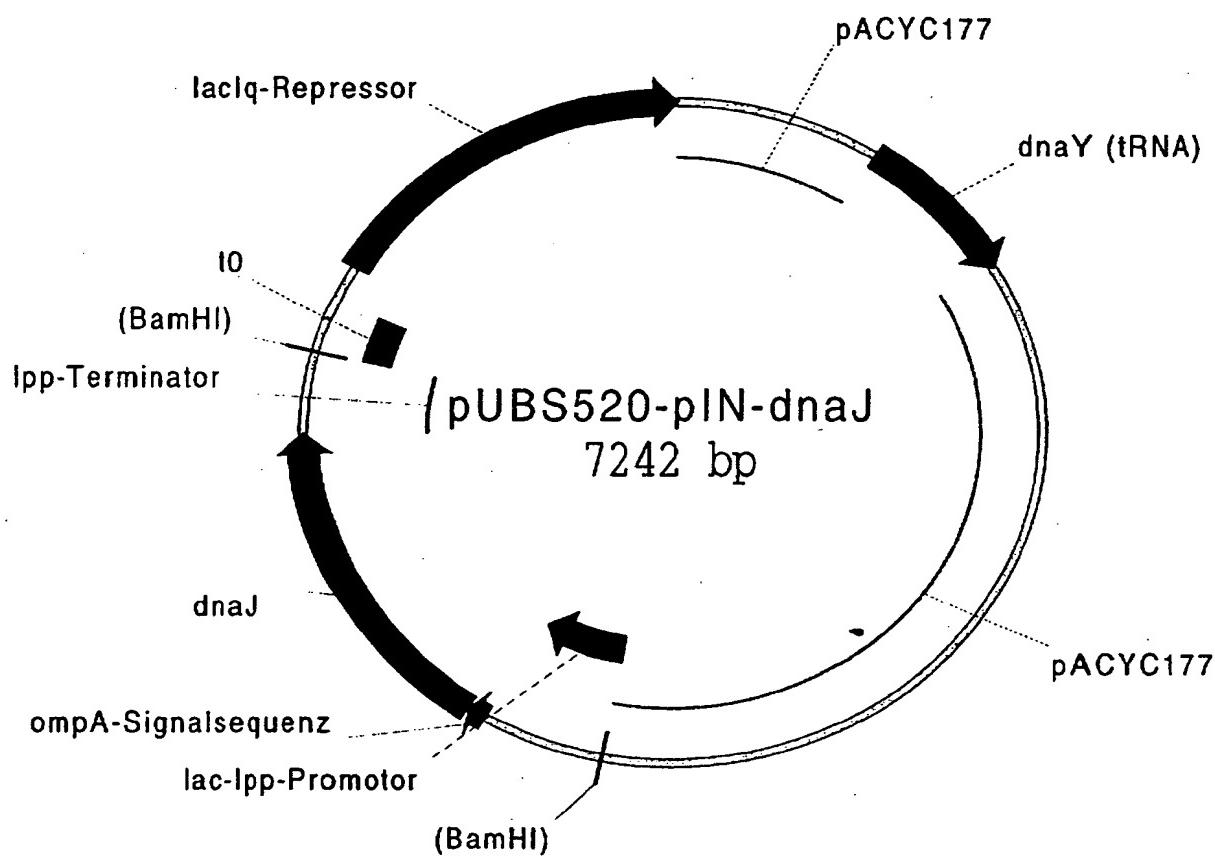


Fig. 4

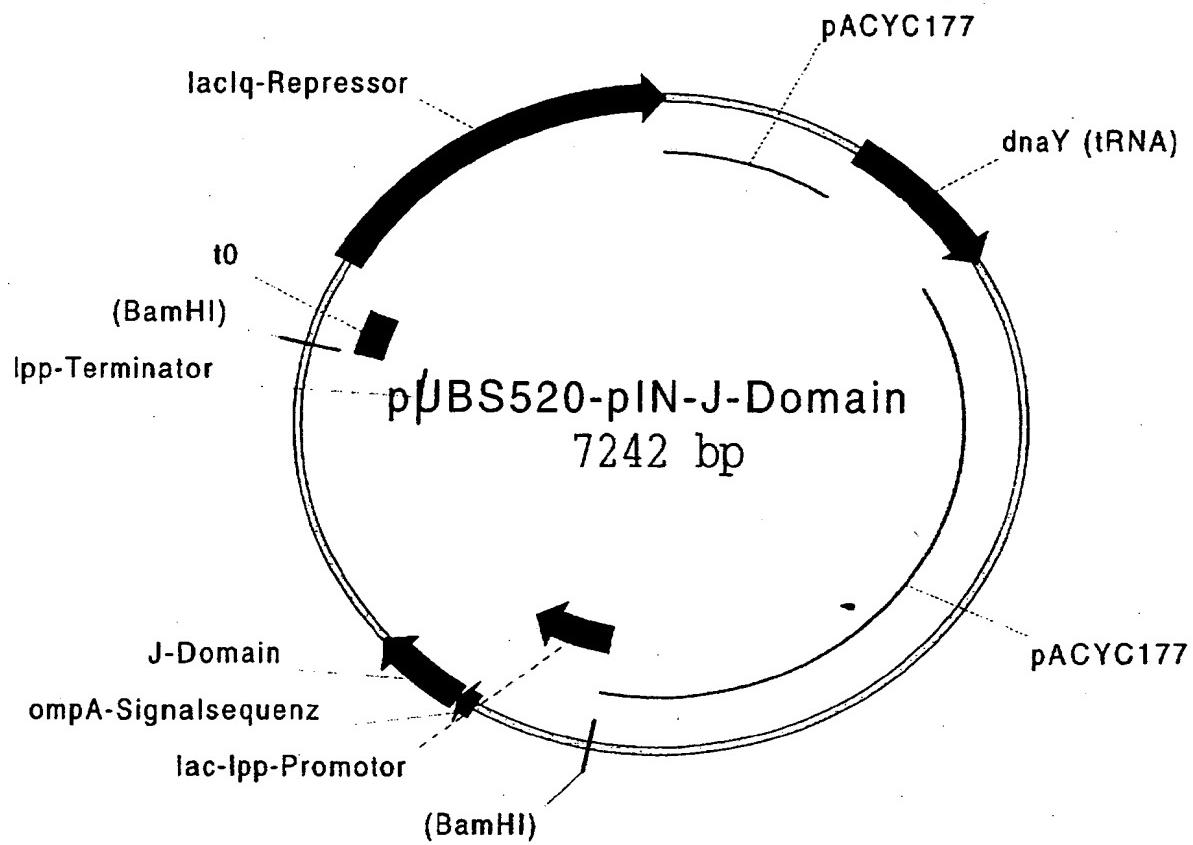


Fig. 5

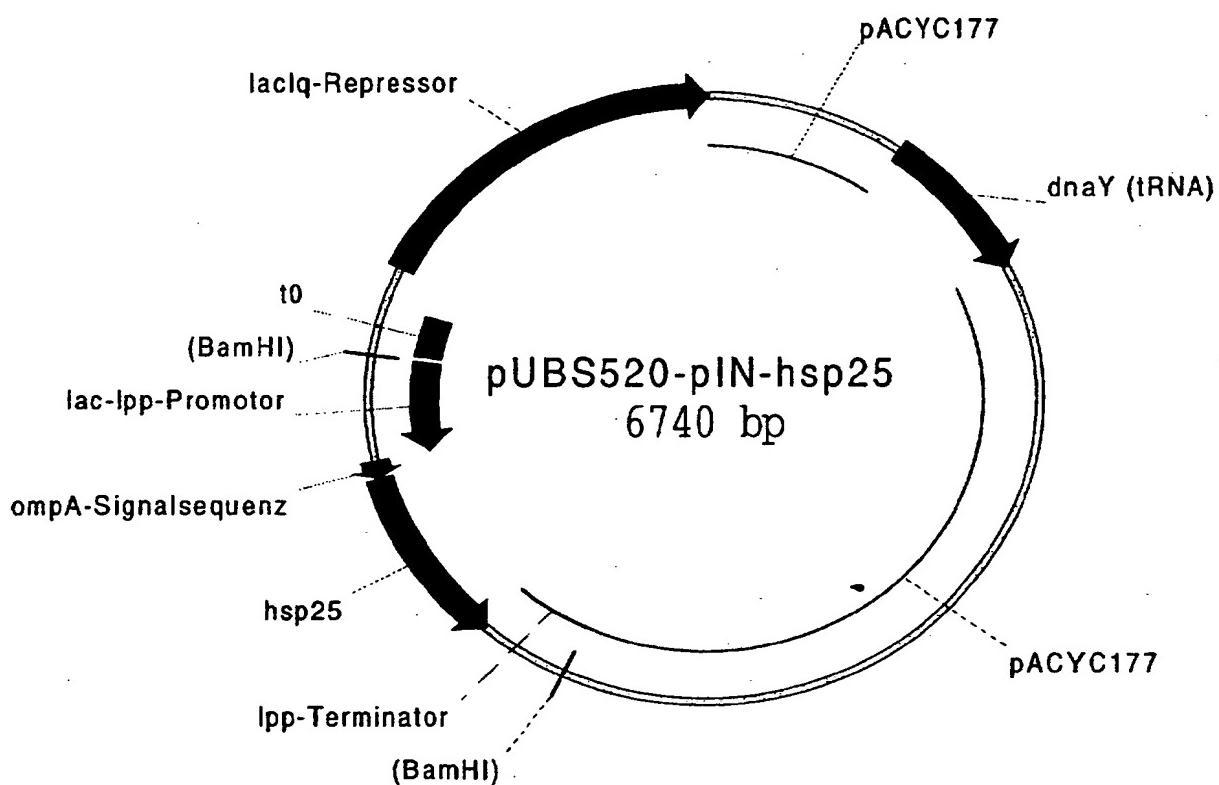


Fig. 6

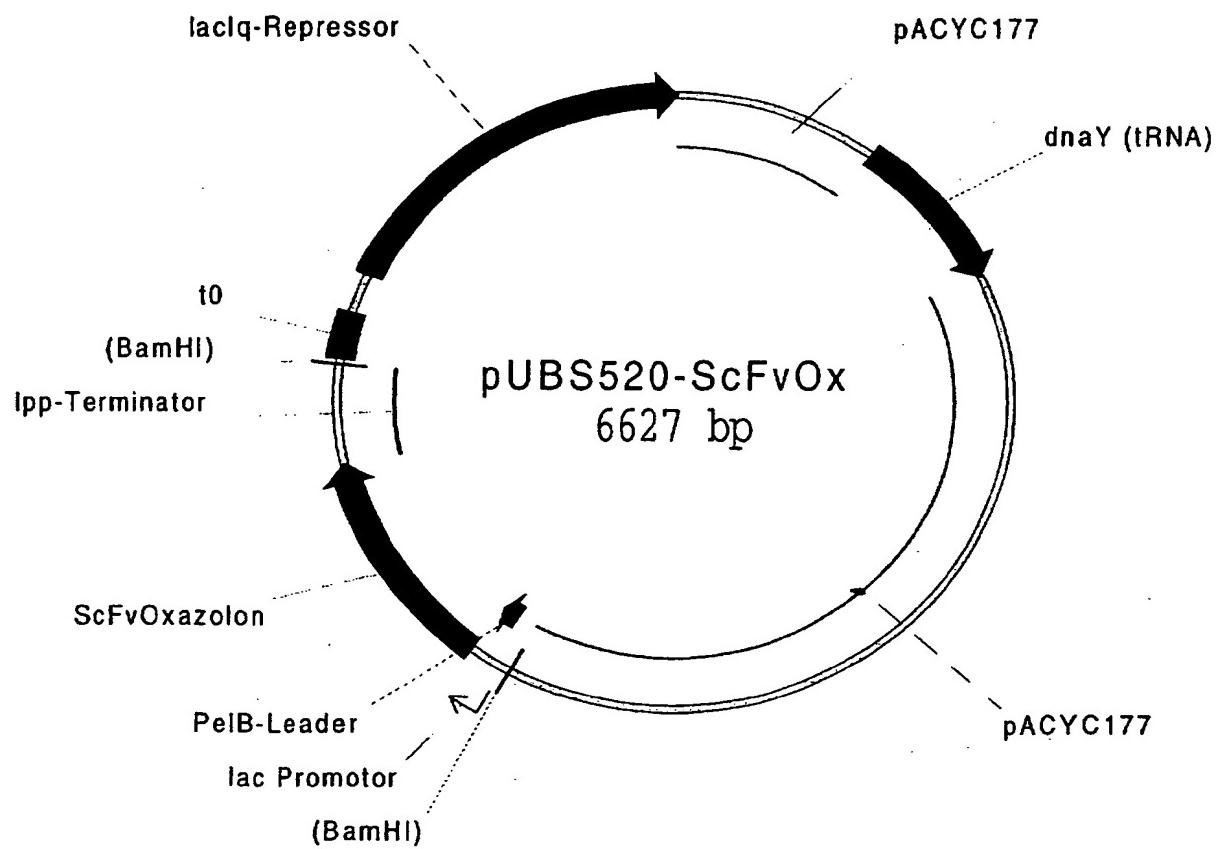
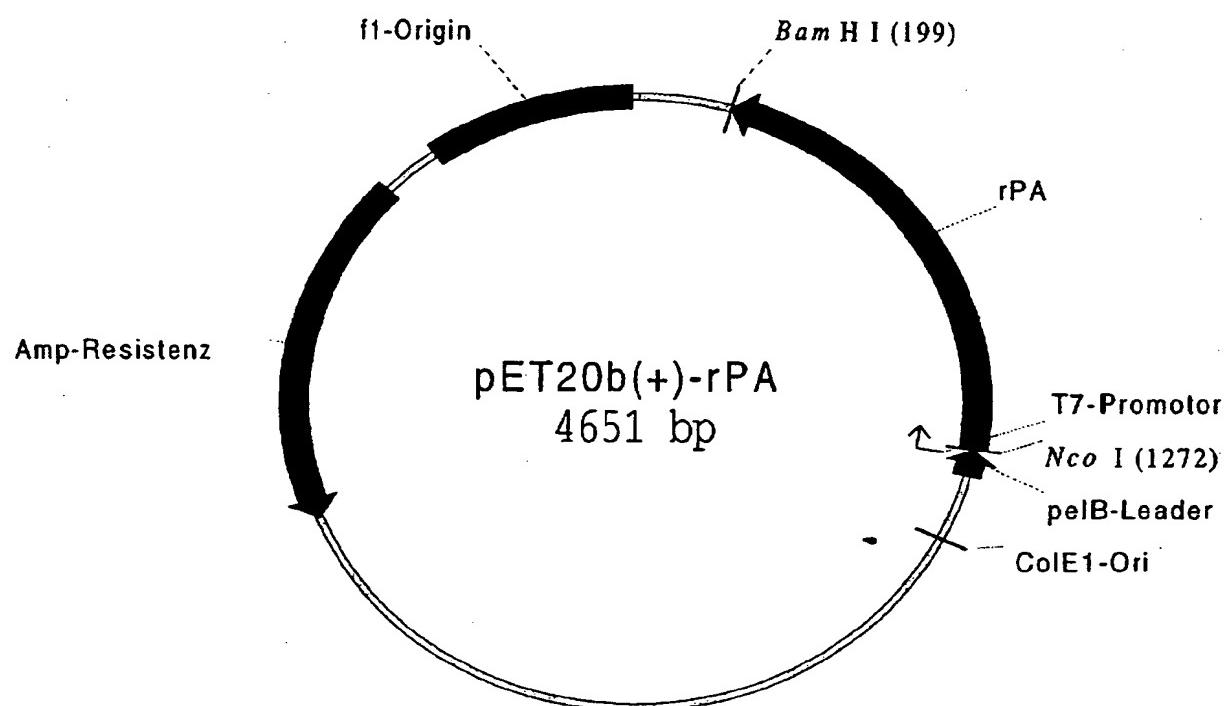


Fig. 7





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 11 4811

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSEFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	WO 98 18946 A (GENENTECH INC) 7. Mai 1998 (1998-05-07)	1,5-10	C12N15/58 C12N15/62
Y	* das ganze Dokument *	2-4	C12N15/31 C12N9/72
X	WO 96 14422 A (GENENTECH INC) 17. Mai 1996 (1996-05-17)	1,5-10	C07K14/245 C07K1/113
Y	* das ganze Dokument *	2-4	C12N1/20 C12N15/70
Y	EP 0 219 874 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 29. April 1987 (1987-04-29)	2,4	C12P21/02
	* das ganze Dokument *		
Y	K.-ICHI YOKOYAMA ET AL.: "Overproduction of DnaJ in Escherichia coli improves in vivo solubility of the recombinant Fish-derived transglutaminase" BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY BIOCHEMISTRY, Bd. 62, Nr. 6, Juni 1998 (1998-06), Seiten 1205-1210, XP002114992 TOKYO JP	2	
	* das ganze Dokument *		
Y	EP 0 885 967 A (HSP RESEARCH INST INC) 23. Dezember 1998 (1998-12-23)	2	C12N C07K C12P
	* das ganze Dokument *		
A	US 4 757 013 A (INOUYE MASAYORI ET AL) 12. Juli 1988 (1988-07-12)	1-10	
	* Spalte 49, Zeile 7 - Spalte 62, Zeile 64		
	*		
A	WO 89 06283 A (INGENE INTERNATIONAL GENETIC E) 13. Juli 1989 (1989-07-13)	1-10	
	* das ganze Dokument *		
A	EP 0 774 512 A (IMANAKA TADAYUKI) 21. Mai 1997 (1997-05-21)	1-10	
	* das ganze Dokument *		
		-/-	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	12. Januar 2000	Hornig, H	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		
A : technologischer Hintergrund	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument		
O : nichtschriftliche Offenbarung	L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument		
P : Zwischenliteratur	& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 99 11 4811

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE		
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betriftt Anspruch
D,A	EP 0 510 658 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 28. Oktober 1992 (1992-10-28) * das ganze Dokument *	1-10
A	M. EHRNSPERGER ET AL.: "The dynamics of HSP25 quaternary structure" J. BIOL. CHEM., Bd. 274, Nr. 21, 21. Mai 1999 (1999-05-21), Seiten 14867-14874, XP002127323 AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL., INC., BALTIMORE, US * das ganze Dokument *	1-10
D,A	M. EHRNSPERGER ET AL.: "Binding of non-native protein to HSP-25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation" EMBO J., Bd. 16, Nr. 2, 15. Januar 1997 (1997-01-15), Seiten 221-229, XP002127324 OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB; * das ganze Dokument *	1-10
		RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.7)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche ...		
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
DEN HAAG	12. Januar 2000	Hornig, H
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		
<input checked="" type="checkbox"/> von besonderer Bedeutung allein betrachtet <input checked="" type="checkbox"/> von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie <input type="checkbox"/> technologischer Hintergrund <input type="checkbox"/> nichttechnische Offenbarung <input type="checkbox"/> Zwischenliteratur		
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 11 4811

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

12-01-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9818946 A	07-05-1998	US 5789199 A AU 4816397 A	04-08-1998 22-05-1998
WO 9614422 A	17-05-1996	US 5639635 A CA 2203373 A EP 0786009 A JP 10508203 T US 5789199 A	17-06-1997 17-05-1996 30-07-1997 18-08-1998 04-08-1998
EP 0219874 A	29-04-1987	DE 3537708 A AT 98648 T AT 131489 T AU 607083 B AU 4132189 A AU 590029 B AU 6599386 A CA 1329157 A CZ 8607526 A DE 3650449 D DE 3689404 D DK 320387 A WO 8702673 A EP 0253823 A EP 0393725 A ES 2061434 T ES 2020498 T FI 872753 A,B, FI 933868 A,B, GR 92300062 T GR 3018410 T HK 153496 A HK 153596 A HR 921075 A HU 43643 A IE 62634 B IL 80325 A JP 2117325 C JP 4218387 A JP 8024594 B JP 7028745 B JP 62502895 T KR 9009139 B LV 5289 A PT 83609 A,B SI 8611796 A,B SK 752686 A	23-04-1987 15-01-1994 15-12-1995 21-02-1991 04-01-1990 26-10-1989 19-05-1987 03-05-1994 17-01-1996 25-01-1996 27-01-1994 23-06-1987 07-05-1987 27-01-1988 24-10-1990 16-12-1994 01-04-1996 22-06-1987 03-09-1993 31-08-1992 31-03-1996 16-08-1996 16-08-1996 30-06-1995 30-11-1987 22-02-1995 21-06-1992 06-12-1996 07-08-1992 13-03-1996 05-04-1995 19-11-1987 22-12-1990 10-10-1993 01-11-1986 31-10-1996 01-10-1996

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 11 4811

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

12-01-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0219874 A		US 5453363 A US 5593865 A YU 179686 A	26-09-1995 14-01-1997 30-06-1988
EP 0885967 A	23-12-1998	JP 11009274 A CA 2235468 A	19-01-1999 20-12-1998
US 4757013 A	12-07-1988	US 4643969 A	17-02-1987
WO 8906283 A	13-07-1989	AT 140731 T AU 2937789 A CA 1338807 A DE 68926882 D DE 68926882 T EP 0396612 A JP 4503151 T US 5618920 A US 5595898 A US 5576195 A US 5693493 A US 5698417 A US 5698435 A US 5846818 A	15-08-1996 01-08-1989 24-12-1996 29-08-1996 13-02-1997 14-11-1990 11-06-1992 08-04-1997 21-01-1997 19-11-1996 02-12-1997 16-12-1997 16-12-1997 08-12-1998
EP 0774512 A	21-05-1997	JP 9173078 A	08-07-1997
EP 0510658 A	28-10-1992	DE 4113750 A AT 109205 T AU 636537 B AU 1515992 A CA 2066370 A, C DE 59200312 D DK 510658 T ES 2057944 T FI 921838 A IE 65792 B JP 2033750 C JP 5268983 A JP 7053118 B KR 9602869 B NO 921574 A NZ 242492 A	29-10-1992 15-08-1994 29-04-1993 19-11-1992 27-10-1992 01-09-1994 28-11-1994 16-10-1994 27-10-1992 29-11-1995 19-03-1996 19-10-1993 07-06-1995 27-02-1996 27-10-1992 27-09-1993

EPO FORM P061

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82